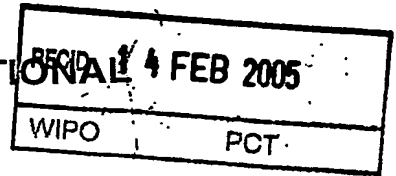


TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)





Référence du dossier du déposant ou du mandataire	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/PEA/416)	
Demande internationale No. PCT/FR 03/02996	Date du dépôt international (jour/mois/année) 10.10.2003	Date de priorité (jour/mois/année) 10.10.2002
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N5/08		
Déposant CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE et al		

- Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
- Ce RAPPORT comprend 8 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).
 Ces annexes comprennent 4 feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants :

- I ☒ Base de l'opinion
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☒ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 06.05.2004	Date d'achèvement du présent rapport 10.02.2005
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Bladier, C N° de téléphone +49 89 2399-7306 

PCT/FR 03/02996

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n°

PCT/FR 03/02996

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport.)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

IV. Absence d'unité de l'invention

1. En réponse à l'invitation à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles, le déposant a :

- ☒ limité les revendications.
☐ payé des taxes additionnelles.
☒ payé des taxes additionnelles sous réserve.
☐ ni limité les revendications ni payé des taxes additionnelles.

2. ☐ L'administration chargée de l'examen préliminaire international estime qu'il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité d'invention et décide, conformément à la règle 68.1, de ne pas inviter le déposant à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles.

3. L'administration chargée de l'examen préliminaire international estime que, aux termes des règles 13.1, 13.2 et 13.3,

- ☐ il est satisfait à l'exigence d'unité de l'invention.
☐ il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité de l'invention, et ce pour les raisons suivantes :

4. En conséquence, les parties suivantes de la demande internationale ont fait l'objet d'un examen préliminaire international lors de la formulation du présent rapport :

- ☐ toutes les parties de la demande.
☒ les parties relatives aux revendications nos 1-16 .

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration :
Nouveauté

Oui: Revendications 1-3, 7-16

Non: Revendications 4-6

Activité inventive

Oui: Revendications 1-3, 7

Non: Revendications 4-6, 8-16

Possibilité d'application industrielle

Oui: Revendications 1-16

Non: Revendications

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Concernant le point I

Base de l'opinion

1. Les **revendications modifiées 1-16** introduites avec la lettre du 03.12.2004 n'étendent pas l'objet de la demande au-delà du contenu de la demande telle qu'elle a été déposée; elles sont donc conformes à l'Article 34(2)(b) PCT.

Concernant le point IV

Absence d'unité de l'invention

2. En réponse à l'invitation à restreindre les revendications ou à payer les taxes additionnelles d'examen, envoyée par l'Autorité chargée de l'Examen Préliminaire International (AEPI) le 22.06.2002, la demanderesse a choisi de payer une partie des taxes additionnelles d'examen et d'éliminer une partie des revendications. Les nouvelles **revendication 1-16** remplissent les conditions d'unité d'invention telles que définies dans l'Article 34(3) et les Règles 13 et 68 PCT.

Concernant le point V

Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

Documents cités

3. Il est fait référence aux documents suivants:

- D1: HUTCHINGS H. *et al.*, "Pigment epithelium-derived factor exerts opposite effects on endothelial cells of different phenotypes", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 294(4), 21 juin 2002, p764-769
- D5: WITTE L. *et al.*, "Monoclonal antibodies targetting the VEGF receptor (FLK1/KDR) as an antiangiogenic therapeutic strategy", CANCER AND METASTASIS REVIEWS, 17(2), 1998, p155-161

Novelty - Article 33(2) PCT

4. L'AEPI est d'avis que l'objet des **revendications 4-6** n'est pas conforme au critère de nouveauté tel que défini par l'Article 33(2) PCT.

L'objet des revendications 4-6 vise un anticorps polyclonal ou monoclonal dirigé contre les cellules endothéliales de phénotype angiogénique selon la revendication 1. Etant donné que les cellules endothéliales de phénotype angiogénique selon la revendication 1 expriment le récepteur VEGFR2, "un anticorps dirigé contre les cellules endothéliales de phénotype angiogénique selon la revendication 1" peut être un anticorps dirigé contre le récepteur VEGFR2. Le document D5 décrit des anticorps monoclonaux qui sont dirigés contre VEGFR2 et qui bloquent la croissance des tumeurs en inhibant l'angiogénèse (voir par exemple p157, colonne de droite, 2ème et 3ème paragraphes). Le document D5 anticipe donc l'objet des **revendications 4-6** (Article 33(2) PCT).

Il est à noter que l'AEPI reconnaît que les résultats complémentaires de l'Annexe 2 démontrent que les anticorps monoclonaux décrits dans la présente demande et dirigés contre les cellules endothéliales de l'invention ne se fixent pas au récepteur VEGFR2. Toutefois l'objet des revendications 4-6, tel qu'il est actuellement formulé, n'est pas limité à ces anticorps. Il englobe également des anticorps monoclonaux pouvant être dirigés contre le récepteur VEGFR2 et inhibant l'angiogénèse, autrement dit il englobe aussi des anticorps tels que décrits dans D5. Il n'est donc pas nouveau.

5. L'AEPI est d'avis que l'objet **des revendication 1-3 et 7-16** est conforme au critère de nouveauté tel que défini par l'Article 33(2) PCT.

- 5.1. Le document D1 décrit deux types de cellules endothéliales de rétine: les cellules BRECV (cultivées en présence de VEGF) et les cellules BRECO (cultivées sans VEGF). Les cellules BRECV forment des tubes lorsqu'elles sont en présence de VEGF dans un gel de collagène et elles prolifèrent sous l'action du VEGF (voir 'Materials' p765, colonne de gauche l8-11, p766 colonne de gauche l2-5, p768, colonne de gauche l10-18). Leur expression de VEGFR2 est identique à celle des cellules correspondantes de phénotype non angiogénique (BRECO), et inférieure à celle des cellules des revendications 1 et 2 (voir p766, colonne de droite, second paragraphe, figure 2 et voir résultats complémentaires de l'Annexe 1). Par

conséquent les cellules BRECV décrites dans le document D1 diffèrent des cellules **des revendications 1 et 2.**

5.2. Le procédé de préparation de cellules endothéliales angiogéniques décrit dans le document D1 se caractérise par la culture des cellules endothéliales en présence de VEGF (voir page 765 'Materials') tandis que le procédé de la revendication 3 se caractérise par la culture des cellules endothéliales en présence d'oestradiol et de VEGF. Par conséquent le procédé décrit dans D1 diffère du procédé de la **revendication 3.**

5.3. L'objet des **revendications 7-16** n'est pas trouvé dans l'état de la technique mis à la disposition de l'examineur.

Activité inventive - Article 33(3) PCT

6. L'AEPI est d'avis que l'objet des **revendications 8, 9 et 10-16** n'est pas conforme au critère d'inventivité tel que défini par l'Article 33(3) PCT.

6.1. L'objet des **revendications 8, 9 et 10-14** dérive directement des revendications 4-6 et relève de démarches techniques de routine, par conséquent il n'est pas inventif. Il ne pourrait être considéré comme inventif qu'en combinaison avec un anticorps nouveau et inventif (Article 33(3) PCT).

6.2. L'implication de l'angiogenèse dans les pathologies énoncées dans les **revendications 15 et 16** étant connue, l'utilisation d'anticorps monoclonaux inhibiteur de l'angiogénèse selon les revendications 4-6 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de ces pathologies est évidente pour l'homme du métier (**revendications 15-16**).

7. L'AEPI est d'avis que l'objet des **revendications 1, 2 et 7** est conforme au critère d'inventivité tel que défini par l'Article 33(3) PCT.

Le document D1, qui est considéré comme étant l'état de la technique le plus proche de l'objet de la demande, décrit des cellules endothéliales de phénotype angiogénique (BRECV).

Les cellules endothéliales de phénotype angiogénique des revendications 1 et 2 diffèrent des cellules endothéliales de phénotype angiogénique de D1 en ce qu'elles ont une expression génique différente des cellules BRECV (voir résultats complémentaires de l'Annexe 1).

L'effet technique relié à cette différence est la capacité des cellules des revendications 1 et 2 à générer des anticorps présentant une activité anti-tumorale.

Le problème technique qui découle de cette différence est donc de trouver comment générer des anticorps présentant une activité anti-tumorale.

La solution à ce problème proposée par la présente demande est l'établissement des cellules endothéliales des revendications 1 et 2.

Il n'existe pas d'indication dans l'état de la technique mis à la disposition de l'AEPI que des cellules endothéliales telles que les cellules des revendications 1 et 2 peuvent générer des anticorps présentant une activité anti-tumorale. Par conséquent, il ne serait pas évident pour l'homme de métier au vu de l'art antérieur de penser à produire de telles cellules pour résoudre le problème sus-mentionné, c'est à dire pour générer des anticorps présentant une activité anti-tumorale. L'AEPI considère donc que les cellules endothéliales de phénotype angiogénique des **revendications 1 et 2** et leur utilisation selon la **revendication 7** pour la préparation d'anticorps présentant une activité anti-tumorale impliquent une activité inventive au sens de l'Article 33(3) PCT.

Concernant le point VIII

Certaines observations relatives à la demande internationale

8. D'après la demanderesse, le procédé de préparation de cellules endothéliales de phénotype angiogénique de la présente demande diffère du procédé de D1 en ce que les cellules sont mises en culture avec du VEGF et de l'oestradiol dès leur prélèvement alors que les cellules BRECV de D1 ne sont mises en présence de VEGF qu'après 7 passages en présence de FGF2. L'AEPI se permet de faire remarquer à la demanderesse que cette caractéristique du procédé n'apparaît pas dans la revendication 3. En effet, dans sa formulation actuelle, la revendication 3 ne

spécifie pas que les cellules endothéliales sont incubées dès leur mise en culture en présence de VEGF et d'oestradiol. Par conséquent dans l'état actuel, il manque au procédé de la revendication 3 une caractéristique essentielle pour la mise en oeuvre du procédé, c'est à dire pour l'obtention des cellules endothéliales de phénotype angiogénique de la revendication 1. Par ailleurs, il manque également une autre caractéristique essentielle pour la mise en oeuvre du procédé. Il s'agit de la composition du milieu de culture du clone jusqu'à obtention de la confluence des cellules. Par conséquent, la **revendication 3** ne remplit pas les conditions visés à l'Article 6 PCT en combinaison avec la Règle 6.3(a)(b) PCT (voir aussi les Directives du PCT C-5-05) qui prévoient qu'une revendication indépendante doit contenir toutes les caractéristiques techniques essentielles à la définition de l'invention.

9. L'objet des **revendications 4, 6, 8, 9-12** vise en partie un anticorps dirigé contre les cellules endothéliales de phénotype angiogénique et activateur de l'angiogénèse, des anticorps anti-idiotypiques dirigés contre ces anticorps et activateurs de l'angiogénèse, ainsi que des anticorps anti-anti-idiotypiques activateurs de l'angiogénèse. Cet objet ne bénéficie d'aucun support substantiel dans la description. En effet, il n'y a aucun résultat prouvant l'obtention d'anticorps capables d'activer l'angiogénèse. Les données de la figure 6 démontrent seulement que des anticorps dit de type 5 stimulent la prolifération des cellules F/0. Ils ne démontrent pas qu'ils activent l'angiogénèse étant donné qu'aucun test d'angiogénèse *in vitro* n'a été effectué sur les cellules F/0. Les données ne précisent pas non plus si ces anticorps de type 5 sont des anticorps de type A, B ou C c'est à dire s'ils sont dirigés contre les cellules endothéliales de phénotype angiogénique ou bien contre les cellules endothéliales de phénotype non angiogénique. Par conséquent, l'AEPI est d'avis que la partie de l'objet des **revendications 4, 6, 8, 9-12** qui vise des anticorps activateurs de l'angiogénèse ne satisfait pas aux conditions requises par les Articles 5 et 6 PCT.

REVENDICATIONS

1. Cellules endothéliales de phénotype angiogénique, présentant les propriétés suivantes :

5 – elles forment des tubes lorsqu'elles sont mises en présence du facteur de croissance VEGF dans un gel de collagène,

 – elles prolifèrent sous l'action du VEGF,

 – elles sont protégées de l'apoptose par le VEGF, et

10 – leur expression de VEGFR-2 est 4 fois supérieure à celle des cellules correspondantes de phénotype non angiogénique,

 et caractérisées en ce qu'elles sont susceptibles de générer des anticorps présentant une activité anti-tumorale.

15 2. Cellules endothéliales selon la revendication 1, caractérisées en ce que ce sont des cellules endothéliales de vaisseau, notamment des cellules endothéliales d'aorte, de cortex surrénal, de peau, de cerveau, de veine ou d'artère de cordon ombilical.

20 3. Procédé de préparation de cellules endothéliales de phénotype angiogénique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

 – l'incubation de cellules endothéliales, notamment prélevées d'une aorte dans un milieu contenant de l'œstradiol et du VEGF, afin d'obtenir des clones de cellules endothéliales de phénotype angiogénique,

25 – le prélèvement d'un clone à l'aide d'une micropipette, parmi les clones susmentionnés, de cellules endothéliales de phénotype angiogénique, et la culture de ce clone jusqu'à l'obtention de la confluence des cellules,

 – la sélection des cellules endothéliales de phénotype angiogénique, par vérification du phénotype des cellules obtenues à l'étape précédente, à l'aide de tests de prolifération, de migration ou d'angiogenèse *in vitro*.

30 4. Anticorps polyclonal ou monoclonal dirigé contre les cellules endothéliales de phénotype angiogénique selon la revendication 1, notamment anticorps monoclonal capable d'activer ou d'inhiber l'angiogenèse.

5. Anticorps monoclonal selon la revendication 4, inhibant l'angiogenèse.

6. Anticorps monoclonal selon la revendication 4 ou 5, présentant les caractéristiques suivantes :

- il se lie à la surface des cellules endothéliales de phénotype angiogénique, et
- il reconnaît un motif présent exclusivement sur les cellules endothéliales de phénotype angiogénique, notamment un récepteur membranaire.

7. Procédé de préparation d'un anticorps monoclonal selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- l'immunisation d'un animal par injection de cellules de phénotype angiogénique selon la revendication 1,

- la fusion entre des myélomes d'un animal et des splénocytes d'un animal afin d'obtenir des hybridomes,

- la mise en culture des hybridomes ainsi obtenus,
- le clonage d'hybridomes, choisis parmi ceux obtenus à l'étape précédente et sécrétant des anticorps contre les cellules de phénotype angiogénique selon la revendication 1,

- la vérification des propriétés d'inhibition de l'angiogenèse des anticorps susmentionnés vis-à-vis des cellules angiogéniques, notamment à l'aide du test de prolifération et/ou de migration et/ou d'angiogenèse *in vitro*.

8. Anticorps anti-idiotypiques dirigés contre des anticorps monoclonaux eux-mêmes dirigés contre des cellules endothéliales de phénotype angiogénique selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils sont capables d'activer ou d'inhiber les fonctions exercées (activation ou inhibition de l'angiogenèse) par les anticorps selon l'une quelconque des revendications 4 à 6.

9. Fragments Fab des anticorps monoclonaux ou polyclonaux selon l'une des revendications 4 à 6, et des anticorps anti-idiotypiques selon la revendication 8, lesdits fragments étant capables d'activer ou d'inhiber l'angiogenèse.

10. Procédé de préparation des anticorps anti-idiotypiques selon la revendication 8, dirigés contre des anticorps monoclonaux eux-mêmes dirigés contre des cellules endothéliales de phénotype angiogénique, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 5 – l'immunisation d'un animal par injection d'anticorps monoclonaux selon la revendication 4,
- la fusion entre des myélomes d'un animal et des splénocytes d'un animal, afin d'obtenir des hybridomes,
- la mise en culture des hybridomes ainsi obtenus,
- 10 – le clonage d'hybridomes, choisis parmi ceux obtenus à l'étape précédente et sécrétant des anticorps dirigés contre les anticorps monoclonaux susmentionnés, utilisés pour l'immunisation, lesdits anticorps monoclonaux étant dirigés contre les cellules de phénotype angiogénique, et
- la vérification des propriétés d'inhibition des anticorps susmentionnés vis-à-vis
- 15 de la fonction d'activation ou d'inhibition de l'angiogenèse des anticorps selon la revendication 4, notamment à l'aide du test de prolifération et/ou de migration et/ou d'angiogenèse *in vitro*.

20 11. Anticorps anti-anti-idiotypiques dirigés contre des cellules endothéliales de phénotype angiogénique selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils sont capables d'activer ou d'inhiber l'angiogenèse.

25 12. Procédé de préparation des anticorps anti-anti-idiotypiques selon la revendication 11, dirigés contre des cellules endothéliales de phénotype angiogénique, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- l'immunisation d'un animal par injection d'anticorps anti-idiotypiques selon la revendication 8,
- la fusion entre des myélomes d'un animal et des splénocytes d'un animal afin d'obtenir des hybridomes,
- 30 – la mise en culture des hybridomes ainsi obtenus,
- le clonage d'hybridomes, choisis parmi ceux obtenus à l'étape précédente et sécrétant des anticorps anti-anti-idiotypiques dirigés contre les cellules de phénotype angiogénique, et

— la vérification des propriétés d'inhibition ou d'activation de l'angiogenèse des anticorps anti-anti-idiotypiques susmentionnés, notamment à l'aide du test de prolifération et/ou de migration et/ou d'angiogenèse *in vitro*.

5 13. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient, à titre de substance active, un inhibiteur de l'angiogenèse, choisi parmi un anticorps selon l'une des revendications 4 ou 5, un anticorps anti-idiotypique selon la revendication 8, un fragment Fab selon la revendication 9, en association avec un vecteur pharmaceutiquement acceptable, ladite composition pharmaceutique étant susceptible
10 d'être administrée à raison d'environ 0,01 à environ 20 mg/kg/injection.

14. Composition vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre de substance active un anticorps monoclonal selon l'une des revendications 4 à 6, ou un anticorps anti-idiotypique selon la revendication 8, ou des fragments Fab selon la
15 revendication 9, ou un anticorps anti-anti-idiotypique selon la revendication 11, en association avec un adjuvant pharmaceutiquement acceptable.

15. Utilisation d'un inhibiteur de l'angiogenèse, choisi parmi un anticorps selon l'une des revendications 4 à 6, un anticorps anti-idiotypique selon la revendication 8, un
20 fragment Fab selon la revendication 9, ou un anticorps anti-anti-idiotypique selon la revendication 11, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies nécessitant l'inhibition de la prolifération endothéliale, notamment dans le cadre des pathologies suivantes : les cancers, la dégénérescence musculaire liée à l'âge, les rétinopathies diabétiques, la polyarthrite rhumatoïde, les angiomes, les
25 angiosarcomes, en particulier la maladie de Castelman et le sarcome de Kaposi.

16. Utilisation d'un inhibiteur de l'angiogenèse, choisi parmi un anticorps selon l'une des revendications 4 à 6, un anticorps anti-idiotypique selon la revendication 8, un
30 fragment Fab selon la revendication 9, ou un anticorps anti-anti-idiotypique selon la revendication 11, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies nécessitant l'inhibition de l'activation endothéliale, notamment dans le cadre des pathologies suivantes : le rejet d'allogreffe et de xénogreffe, les acrocyanoses, les sclérodermies, ou dans le cadre de la préparation de greffons entre le prélèvement et la transplantation.